



Государственный комитет  
СССР  
по делам изобретений  
и открытий

# О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

## К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(11) 943282

(61) Дополнительное к авт. свид-ву -

(22) Заявлено 13.07.79 (21) 2781356/28-13

с присоединением заявки № -

(23) Приоритет -

Опубликовано 15.07.82. Бюллетень №26

Дата опубликования описания 15.07.82

(51) М. Кл.<sup>3</sup>

С 12 Р 13/08

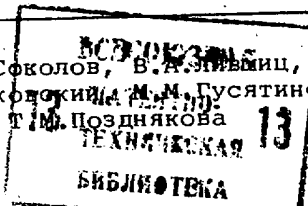
(53) УДК 668.394  
(088.8)

(72) Авторы  
изобретения

В.Г.Дебабов, Н.И.Жданова, А.К.Соколов, В.А.Эпштейн,  
Ю.И.Козлов, Е.М.Хургес, Н.К.Янковский, М.М.Гусятинер,  
А.Ф.Шолин, В.П.Антипов и Т.М.Позднякова

(71) Заявитель

Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики  
и селекции промышленных микроорганизмов



### (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-ТРЕОНИНА

1

Изобретение относится к микробиологической промышленности, а именно к способу получения L-треонина.

Треонин является незаменимой аминокислотой, которая широко применяется как компонент различных питательных смесей медицинского назначения. Кроме того, L-треонин может быть использован в качестве добавки в пищу человека и в корм животных, а так же как реактив для фармацевтической и химической промышленности.

В настоящее время L-треонин получают путем прямой ферментации без предшественников с использованием штаммов продуцентов таких видов как *Brevibacterium flavum*, *Escherichia coli*, *Corinebacterium acetoacidophilum*, *Proteus rettgeri*, *Serratia marcescens*, *Aerobacter aerogenes*, *Corynebacterium glutamicum* на питательных средах, содержащих в качестве источников углерода глюкозу, фруктозу, ацетат, этанол или добавления витаминов и аминокислот или их содержащих субстратов, а также содержащих источники азота и необходимые минеральные соли.

Известен способ получения L-треонина с использованием мутантных

2

штаммов *Escherichia coli* при глубинном культивировании на питательных средах, содержащих углеводы, источники азота, минеральные соли при добавлении в среду чистых аминокислот и витаминов или содержащих их гидролизатов белковой массы. При этом достигнут максимальный выход 10,4 г/л L-треонина в ферментационной среде за 96 ч ферментации [1].

Однако применяемые мутантные штаммы *Escherichia coli* характеризуются потребностью в изолейцине или в изолейцине и метионине.

Известен также способ получения L-треонина путем культивирования продуцирующих его микроорганизмов вида *Escherichia coli* на питательной среде, содержащей источники углерода, азота и необходимые минеральные соли в присутствии антибиотика с последующим выделением целевого продукта [2].

Общим недостатком описанных способов является невысокий уровень накопления L-треонина на углеводах, в частности на глюкозе, которая является предпочтительным сырьем при производстве L-треонина для медицинских целей, кроме того, слишком

30

большое время ферментации (96-120 ч) на этом сырье.

Цель изобретения - повышение выхода продукта и сокращение времени ферментации.

Поставленная цель достигается тем, 5 что согласно способу в качестве микроорганизмов, продуцирующих L-треонин, из вида *Escherichia coli* используют штамм *Escherichia coli* ВНИИгенетика М-1, а в качестве антибиотика - пенициллин.

При этом пенициллин вносят в исходную питательную среду в количестве 0,1-0,5 г/л.

Кроме того, культивирование ведут на питательной среде, содержащей питательную добавку в виде гидролизата белковой массы, например кислотного гидролизата, ферментолизата или автолизата дрожжей.

Причем в процессе культивирования целесообразно вводить сбалансированную подпитку, содержащую глюкозу и раствор аммиака.

Штамм ВНИИгенетика М-1 отобран в расसेве штамма VL 334 р UN 7. От исходного штамма он отличается заметным мукоидным характером поверхности колоний, повышенной способностью к продукции треонина, более высокой стабильностью при росте на средах с питательными добавками, т.е. способностью популяции клеток сохранить основные свойства (продукция треонина и устойчивость к пенициллину) после культивирования в этих условиях. Штамм депонирован в Центральном музее промышленных микроорганизмов при институте ВНИИгенетика и имеет регистрационный номер ЦММБ-1856.

Штамм ВНИИ-генетика М-1 сохраняет полезные генетические свойства исходного штамма ВНИИгенетика VL 334 р UN 7 (способность к сверхсинтезу треонина и устойчивость к пенициллину, что определяется содержанием в клетках амплифицированной гибридной плазмиды рUN 7), но отличается от него рядом морфологических признаков, более высокой стабильностью сохранения своей популяции клеток в ходе ферментации на средах с питательными добавками и способностью к более высокому уровню накопления L-треонина.

Введение в исходную питательную среду пенициллина 0,1-0,5 г/л позволяет использовать обогащенную питательными веществами среду без потери основных свойств штамма и тем самым резко повысить скорость наращивания биомассы в начальной стадии ферментации, за которой следует процесс интенсивного биосинтеза L-треонина.

Предлагаемый способ предусматривает ведение процесса ферментации в оптимальных условиях, за счет поддержания в ходе процесса оптимального соотношения углерода и азота и постоянного уровня pH, что достигается путем введения в ходе ферментации сбалансированной подпитки, содержащей глюкозу и раствор аммиака.

Предлагаемый способ позволяет 10 получить в ферментерах емкостью 0,5 л до 30 г/л L-треонина за 40 ч ферментации на питательной среде, содержащей глюкозу, минеральные соли и питательные добавки в виде гидролизата, ферментолизата или автолизата биомассы дрожжей при добавлении в исходную питательную среду пенициллина 0,1-0,5 г/л.

Характеристика штамма *Escherichia coli* ВНИИгенетика М-1.

Штамм *Escherichia coli* ВНИИгенетика М-1, продуцирующий L-треонин хранится в Центральном музее промышленных микроорганизмов института ВНИИгенетика и имеет регистрационный номер В-1856.

Морфологические признаки. Грамотрицательные слабо подвижные тонкие палочки с закругленными концами, 30 размером 1,5-2 мм в длину.

Культурально-физиологические признаки. Мясо-пептонный агар. Через 24 ч роста при 37°C образует круглые, беловатые, полупрозрачные на свет колонии, диаметром 2-3 мм, 35 поверхность колонии гладкая, края ровные или слегка волнистые, центр колоний приподнят, структура однородная, консистенция пастообразная, легко эмульгируется.

Агаризованная минимальная среда (Адамса) с глюкозой. Через 2-е сут роста при 37°C образует колонии диаметром 1-1,5 мм, серовато-белые, круглые с ровными краями, слегка выпуклые, внутренняя структура однородная, 45 поверхность блестящая, через 4-5 сут колонии приобретают слизистую (мукоидную) консистенцию.

Рост в мясо-пептонном бульоне. После 24 ч роста при 37°C наблюдается сильное помутнение, небольшой осадок, запах характерный.

Рост в жидкой минимальной среде Адамса. Через двое сут роста при 37°C с аэрацией наблюдается сильное равномерное помутнение, запах отсутствует.

Рост по уколу в мясо-пептонном агаре - хороший по всему уколу.

Желатину - не разжижает. 60 На молоке - хороший рост с коагуляцией молока.

Индол - образует.

Рост на различных углеводах. Хорошо растет на глюкозе, лактозе, маннозе, галактозе, ксилозе, фруктозе, 65

глицероле и маннитоле с образованием кислоты и газа.

Устойчивость к антибиотикам. Устойчив к пенициллину.

Штамм не патогенен.

Содержание плазмиды. В логарифмической стадии роста клетки содержат около 17 копий плазмиды pUN 7 (мол. вес 5,7 мегадальтон), обеспечивающей устойчивость штамма к пенициллину и несущей гены треонинового оперона.

Потребность в факторах роста. Растет на минимальной глюкозо-солевой среде (время генерации 240 мин). Рост стимулируется изолейцином (время генерации 60 мин).

Способ осуществляется следующим образом.

Посевной материал культуры микроорганизма *Escherichia coli* ВНИИгенетика М-1 выращивают в течение 48 ч на агаризованной минимальной среде, содержащей пенициллин (500 мкг/мл), и затем смывом физиологическим раствором клеток с поверхности косяка готовят клеточную суспензию, которую используют для засева ферментационной среды. Начальная концентрация клеток в рабочем ферментере может составлять около  $2-5 \cdot 10^3$  кл./мл. Исходная питательная среда содержит глюкозу, минеральный азот, соли, пенициллин и питательные добавки в виде гидролизатов белковой массы, например кислотных гидролизатов, автолизатов или ферментализатов дрожжей. Начальный pH среды устанавливают на уровне 7,0-7,2 и затем автоматически поддерживают в этих пределах в ходе ферментации с помощью датчика pH путем введения сбалансированной подпитки, содержащей аммиак (водный раствор) и глюкозу. В виду того, что снижение pH среды в ходе культивирования продуцента треонина обусловлено уменьшением концентрации аммония (азота) в среде вследствие утилизации его продуцентом, а соотношение между скоростями утилизации азота и глюкозы остается примерно постоянным, то соотношение между количеством данных компонентов в питательной смеси должно соответствовать соотношению между скоростями утилизации этих компонентов культурой продуцентом, что и достигается путем выделения в ходе ферментации вышеуказанной подпитки. Температуру поддерживают на уровне 35-37°C. Через 40-43 ч ферментации образованный в питательной среде L-треонин выделяют следующим методом. Биомассу клеток продуцента отделяют либо сепарированием, либо фильтрованием пос-

ле предварительной обработки окисью кальция (известковым молоком) и ортофосфорной кислотой. С учетом содержания треонина и катионов в нативном растворе, а также пигментных соединений нативный раствор пропускают через ряд последовательно соединенных колонн с осветляющим сорбентом для поглощения окрашенных соединений и сульфокатионитом, например, КУ-2-8, Диайон SK-1В или другим аналогичного типа в Н-форме, для сорбции катионов и треонина.

Сорбированный треонин элюируют с колонны с сульфокатионитом раствором аммиака. Фракции элюата, содержащие основное количество треонина, упаривают под вакуумом, охлаждают и кристаллизуют треонин. Для ускорения кристаллизации может быть использовано добавление спирта. Полученный треонин хроматографически однороден и содержит 97-99% основного вещества. Для получения препаратов для проведения дополнительной перекристаллизацию. Такие препараты могут быть использованы в средах для культивирования клеток тканей. Выход по предлагаемому методу 80-95%. При высокой концентрации треонина в культуральной жидкости (выше 18 г/л) относительно низком содержании примесей треонин может быть выделен без использования стадии сорбции на ионитах. Для этого осветленный раствор концентрируют уравниванием в вакууме при невысоких температурах и кристаллизуют треонин при пониженной температуре с добавкой или без добавки этилового спирта. После перекристаллизации получают L-треонин с содержанием основного вещества 99%.

Пример 1. Посевной материал культуры продуцента *Escherichia coli* ВНИИгенетика М-1 выращивают в течение 48 ч на агаризованной минимальной глюкозосолевой среде, следующего состава, г/л: глюкоза 5,0;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  3,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1; пенициллин 500 мкг/мл, агар-агар 20,0; вода дистиллированная, pH 7,0-7,2. Глюкоза и пенициллин стерилизуются отдельно и добавляются в расплавленную среду перед ее охлаждением и посевом. Выросшую культуру смывают стерильной водопроводной водой, и полученную клеточную суспензию используют для засева ферментеров.

Ферментацию проводят на лабораторном ферментере емкостью 0,5 л. Состав исходной питательной среды, об. %:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,8%
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,2%
$\text{MgSO}_4$	0,04%

Кислотный гидролизат  
БВК (в расчете на сухой вес) 0,3%

Пеногаситель 0,1%

Питательную среду стерилизуют совместно с аппаратом, после чего вводят в среду стерильную глюкозу 2% и пенициллин 0,5 г/л. Ферментацию ведут при температуре 35-37°C с введением сбалансированной подпитки, содержащей аммиак в количестве 2,5-2,7% и глюкозу в концентрации 35%. Подпитку вводят по сигналу датчика pH. Уровень pH устанавливают в пределах 7,0-7,2, сульфитное число фермента 3,5-4,0 г O<sub>2</sub>/л.ч. Через 40 ч ферментации в культуральной жидкости накапливается L-треонин в количестве 30 г/л. Затраты глюкозы на синтез треонина 6 г/г.

Далее L-треонин выделяют из культуральной жидкости. Для этого к 300 мл культуральной жидкости с концентрацией треонина 30 г/л прибавляют при перемешивании 3 г окиси кальция и затем добавляют ортофосфорную кислоту до достижения величины pH 5,6, раствор нагревают до 60°C выдерживают 10 мин и отделяют биомассу на фильтре под вакуумом. Полученный нативный раствор (оптическая плотность 0,4 при 525 нм в 1 см кювете) пропускают через колонку с 50 мл осветляющей смолы ИА-1р и осветленный раствор (оптическая плотность 0,08) пропускают через колонку со 150 мл сульфокатионита КУ-2-8 в Н<sup>+</sup> - форме, колонку промывают 300 мл воды. Сорбированный треонин элюируют раствором 3%-ного аммиака, элюат упаривают под вакуумом до содержания сухих веществ 25%, добавляют этиловый спирт в соотношении 1:1 и оставляют кристаллизоваться в течение 10 ч при температуре 0° +5°C. Кристаллы L-треонина отфильтровывают, промывают и сушат. Получают 8,1 г L-треонина (выход 90%). Анализ методом ТСХ (10 мкг) показывает отсутствие других аминокислот.

**Пример 2.** Посевной материал культуры продуцента *Escherichia coli* ВНИИгенетика М-1 готовят по примеру 1. Ферментацию ведут на ферментере емкостью 0,5 л. Состав исходной питательной среды по примеру 1 за исключением того, что в качестве питательной добавки используют ферментализат БВК в количестве 0,6 % вместо кислотного гидролизата БВК. Условия ферментации как в примере 1. Через 41 ч ферментации в культуральной жидкости накапливается L-треонин в количестве 29 г/л. Далее L-треонин выделяют из культуральной жидкости. Для этого

300 мл нативного раствора треонина после отделения клеток продуцента центрифугированием культуральной жидкости (сухих веществ в нативном растворе 7,5% оптическая плотность 0,6 (525 нм) упаривают под вакуумом при 50°C до объема 50 мл, добавляют такой же объем этилового спирта и кристаллизуют треонин в течение 5 ч при 0°C. Полученные кристаллы отделяют фильтрованием, промывают 15 мл этилового спирта и сушат. Получают 6,1 г L-треонина, не содержащего по анализу методом ТСХ (10 мкг) примесей других аминокислот.

**Пример 3.** Посевной материал культуры продуцента *Escherichia coli* ВНИИгенетика М-1 готовят по примеру 1. Ферментацию ведут на ферментере емкостью 2 м<sup>3</sup>. Состав исходной питательной среды по примеру 1, за исключением того, что в качестве питательной добавки в питательной среде используют автолизат дрожжей в количестве 0,4%, а содержание пенициллина 0,2 г/л. Через 43 ч ферментации в культуральной жидкости накапливается 18 г/л треонина. Расход глюкозы - по примеру 1.

Таким образом, предлагаемый способ превосходит по эффективности все известные способы получения L-треонина на углеводной среде. За 40-43 ч ферментации с использованием нового штамма *Escherichia coli* ВНИИгенетика М-1 на обогащенной питательной среде с добавлением пенициллина в исходную питательную среду, способ позволяет получить в культуральной жидкости до 30 г/л L-треонина без примесей других аминокислот.

#### Формула изобретения

1. Способ получения L-треонина путем глубинного культивирования продуцирующих его микроорганизмов вида *Escherichia coli* на питательной среде, содержащей источники углерода, азота и необходимые минеральные соли в присутствии антибиотика, с последующим выделением целевого продукта, отсюда тем, что, с целью повышения выхода L-треонина и сокращения времени ферментации, в качестве микроорганизмов, продуцирующих L-треонин, из вида *Escherichia coli* используют штамм *Escherichia coli* ВНИИгенетика М-1, а в качестве антибиотика - пенициллин.

2. Способ по п.1, отсюда тем, что пенициллин вно-

сят в исходную питательную среду в количестве 0,1-0,5 г/л.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что культивирование ведут на питательной среде, содержащей питательную добавку в виде гидролизата белковой массы, например кислотного гидролизата, ферментолізата или автолизата дрожжей.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что в процессе куль-

тивирования вводят сбалансированную подпитку, содержащую глюкозу и раствор аммиака.

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе

1. Патент Англии № 1223470, кл. С 2 С, опублик, 1971.
2. Заявка ФРГ № 1792495, кл. С 12 D 13/06, опублик. 1972.

Редактор М.Бандура      Составитель М.Ларина      Техред Ж. Кастелевич      Корректор И.Муска

Заказ 5037/34      Тираж 505      Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР  
по делам изобретений и открытий  
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4